

明 細 書

可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α , その測定方法, 測定用キット
及び医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、ヒトインターロイキン18レセプターの作用解明, 間質性肺炎や感染、関節リウマチ等の自己免疫疾患等の治療薬等に使用することが期待される可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α 及びその測定方法, リウマチ等の自己免疫疾患の診断方法並びに測定用キットに関する。

背景技術

[0002] インターロイキン18(以下、IL-18と記載する。)は、マクロファージの産性するインターフェロン γ (IFN- γ) 誘導因子として1995年に発見された最も新しいサイトカインである[Nature 378,88-91(1995)]。IL-18は、前駆体(pro IL-18)として合成された後、インターロイキン 1 β 変換酵素[カスパーゼ1(caspase-1)]等により切断されて活性型(mature IL-18)となる。マウスIL-18の前駆体は192個のアミノ酸よりなり、その活性型は157個のアミノ酸よりなる。

[0003] また、ヒトIL-18の前駆体は194個のアミノ酸よりなり、その活性型は158個のアミノ酸よりなる。

[0004] IL-18の受容体は、IL-1受容体ファミリーに属し、IL-18R α とIL-18R β とが知られている。

[0005] IL-18は、1型ヘルパーT細胞(Th1)やナチュラルキラー細胞(NK細胞)に作用してIFN- γ の産性を誘導するほか、細胞傷害性T細胞活性を増強させることにより細胞傷害活性を増強することが知られており、Th1応答をもたらす炎症性サイトカインと考えられている。

[0006] これらのことからTh1過剰反応が原因であるインシュリン依存性糖尿病や多発性硬化症およびクローン病等とIL-18との関連が注目されてきた。

[0007] 更に、本発明者は、IL-18の過剰供給が、間質性肺炎や肺線維症等の肺障害の原因となることを突き止めた(WO01/080891)。

- [0008] 従って、IL-18と、IL-18レセプター間の相互作用を制御することによって、過剰発現したIL-18に起因する疾病の予防又は治療に役立つのではないかと仮説をたて、その候補物質として、生体中に存在することが未だ確認されていなかったIL-18レセプター α の可溶化フォームを選択し、その測定方法の開発に着手した。
- [0009] 従来、インターロイキン2については、可溶化ヒトインターロイキン2レセプター α の存在が確認され、またその検出手段として、2カ所の異なるエピトープを認識する2種のモノクローナル抗体を使った酵素免疫測定法(ELISA法)が使用されている。
- [0010] 非特許文献1: PHARMINGEN OptEIA(TM) Human IL-2sR α (CD25) Set カタログ (Catalog # 559104) (2000.8.17, PHARMINGEN, San Diego, CA, USA発行)
- [0011] また、IL-18に関しては、人工的に作成した可溶化ヒトIL-18レセプター α とIL-18 β の組合せが、IL-18によるIFN- γ の産生を阻害することが報告されている。
- [0012] 非特許文献2: The Combination of Soluble IL-18R α and IL-18 β Chains Inhibits IL-18-Induced IFN- γ (Journal of Interferon and cytokine research 22:P.593-601, 2002, Mary and Liebert, Inc.)
- [0013] しかしながら、これらの可溶化レセプターは、IL-18レセプターの細胞外ドメインを可溶化フォームと仮定した上で、それにシグナルペプチド等の配列を人為的に不可したものであり、天然型の可溶化レセプターそのものではない。また、マウスガン細胞株で発現しているため、その立体構造や糖鎖構造も人間の産生するものが異なる可能性もある。つまり、天然型の存在は、依然として知られていなかったため、測定方法も未確立であった。
- [0014] しかも、IFN- γ の産生阻害についても、試験管レベル(in vitro)での実験かつ人工的に作成した可溶化ヒトIL-18レセプター α と β の組合せでなくてはならないとの報告であった。可溶化IL-18レセプター α 単独で生体で(in vivo)の治療剤としての可能性を示唆するものではなかった。
- [0015] 本発明者は、ヒトIL-18レセプター α (ヒトIL-18レセプターの α サブユニット)に、可溶化型が存在するとの考えに基づき、ELISA法を用いて検出を試みてきた。
- [0016] そして用いる2種類の抗体(capture「捕獲」抗体、detect「検出」抗体)としては、可溶化前のヒトIL-18レセプター α と可溶化ヒトIL-18レセプター α との構造が類似性を有

するとの仮説に基づき、ヒトIL-18レセプター α の既存のモノクローナル抗体の中から候補を選択した。しかしながら、既存のモノクローナル抗体は、いずれもヒトIL-18レセプター α を認識する際の結合部位となるエピトープが共通すると考えられており、2種類の既存のモノクローナル抗体を用いたいわゆるサンドイッチ法を用いて検出することは不可能であった。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0017] 本発明者等は、上述の問題を解決するべく研究を重ねた結果、可溶化ヒトIL-18レセプター α の測定方法を確立し、更には、生体内に可溶化ヒトIL-18レセプター α が存在することを確認し、当該可溶化ヒトIL-18レセプター α が疾病の治療薬として有用であることを確認し本発明を完成したものであって、その目的とするところは、可溶化ヒトIL-18レセプター α を認識し、かつエピトープの共通しない抗体の組み合わせを選択し、それを用いたELISA法及び測定用キットを提供すること及び、可溶化ヒトIL-18レセプター α 等を有効成分とする医薬組成物を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0018] 上述の目的は、可溶化ヒトIL-18レセプター α 、下記(A)の抗体を用いることを特徴とする、酵素免疫測定法による可溶化ヒトIL-18レセプター α の測定方法、(A)が以下の(a)であることを特徴とする、当該可溶化ヒトIL-18レセプター α の測定方法、(a)が、以下の(a1)～(a3)のいずれかであることを特徴とする、当該可溶化ヒトIL-18レセプター α の測定方法、もう一方の抗体が、以下の(B)であることを特徴とする、当該可溶化ヒトIL-18レセプター α の測定方法、(B)が以下の(b)であることを特徴とする、当該可溶化ヒトIL-18レセプター α の測定方法、下記(1)の抗体を固層化した第一次抗体と、下記(2)の第二次抗体とを用い、可溶化ヒトIL-18レセプター α を検出することを特徴とする当該可溶化ヒトIL-18レセプター α の測定方法、当該いずれかの可溶化ヒトIL-18レセプター α の測定方法を用いることを特徴とする、自己免疫疾患の診断方法、下記の(A)の抗体を、固層化抗体又は標識化抗体として含有することを特徴とする、可溶化ヒトIL-18レセプター α 測定用キット、一方が固層化され、他方が標識化された(1)及び(2)2種の抗体を含有することを特徴とする、可溶化ヒトIL-18

レセプター α 測定用キット, (X), (Y) 又はこれらをコードする遺伝子からなる群から選択される一種以上を有効成分として含むことを特徴とする医薬組成物, (X), (Y) 又はこれらをコードする遺伝子からなる群から選択される一種以上を有効成分として含むことを特徴とする、IL-18に起因する疾患、リウマチ関連疾患、SLEを含む自己免疫疾患及び感染症の予防又は治療剤, (X), (Y) 又はこれらをコードする遺伝子からなる群から選択される一種以上を有効成分として含むことを特徴とする肺障害及び呼吸器関連疾患の予防又は治療、及び (x) 又は (y) を有効成分として含むことを特徴とする、医薬組成物によって達成される。

[0019] (X) 可溶化ヒトIL-18レセプター α

(Y) 1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつ当該可溶化ヒトIL-18レセプター α と同じ活性を有するタンパク質

(x) ヒトIL-18レセプター α 遺伝子

(y) 1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなりかつ当該可溶化ヒトIL-18レセプター α と同じ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

[0020] (A) H44マウス抗ヒトIL-18レセプター α モノクローナル抗体と同じエピトープを認識し得る、抗ヒトIL-18レセプター α モノクローナル抗体

(a) H44マウス抗ヒトIL-18レセプター α モノクローナル抗体と同じエピトープを認識し得る、マウス抗ヒトIL-18レセプター α モノクローナル抗体

(a1) H44マウス抗ヒトIL-18レセプター α モノクローナル抗体

(a2) MAB840マウス抗ヒトIL-18レセプター α モノクローナル抗体

(a3) 117-10Cマウス抗ヒトIL-18レセプター α モノクローナル抗体

(B) 抗ヒトIL-18レセプター α ポリクローナル抗体

(b) ラビット抗ヒトIL-18レセプター α ポリクローナル抗体

(1) 抗ヒトIL-18レセプター α モノクローナル抗体

(2) 抗ヒトIL-18レセプター α ポリクローナル抗体

[0021] 尚、以下において、「ヒトIL-18レセプター α 」を「hIL-18R α 」, 「可溶化(soluble) IL-18レセプター α 」を「sIL-18R α 」, 「可溶化(soluble) ヒトIL-18レセプター α 」を「shIL-18R α 」と記載することがある。

発明の効果

- [0022] 本発明のshIL-18R α は、IL-18及びIL-18Rシグナルの作用解明、間質性肺炎や感染等の治療薬等に使用することが期待される。また、本発明のshIL-18R α の測定方法は、今まで不可能であった、shIL-18R α の測定ができる点で有意義である。また、本発明の診断方法によって、リュウマチ等の自己免疫疾患の診断が可能となる。更に、本発明のキットは、測定が簡便であり、医療現場で非常に有用である。

発明を実施するための最良の形態

- [0023] 本発明のshIL-18R α (X)は、ヒトの血清中等に存在する、分子量が約60kDaのタンパク質であり、IL-18の他、H44マウス抗hIL-18R α モノクローナル抗体の様な、抗hIL-18R α モノクローナル抗体、及び抗hIL-18R α ポリクローナル抗体との結合能を有するものである。
- [0024] 本発明のshIL-18R α は、後述の本発明の酵素免疫測定法によって、またはヒト及びほ乳類の血清、尿、組織抽出物等や気管支肺胞洗浄液等の生体から、HPLCや抗IL-18R α 抗体を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィー等を用いて分離・精製することができる。また、IL-18R α を過剰発現させた細胞株(例えばヒトNK細胞NK0細胞株やIL-18R α 遺伝子を過剰発現させた細胞株)の培養液から可溶化IL-18受容体をHPLCや抗IL-18R α 抗体を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて精製することができる。
- [0025] また、ヒトリンパ球を刺激した培養上清中から、HPLCや抗IL-18R α 抗体を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いることによっても精製することができる。
- [0026] 更に、IL-18R α を過剰発現させた細胞株(例えばヒトNK細胞NK0細胞株やIL-18R α 遺伝子を過剰発現させた細胞株)やヒリンパ球の培養液にプロテアーゼ(例えばメタロプロテアーゼ、TNF- α の変換酵素(TACE))を加えてから、HPLCや抗IL-18R α 抗体を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて精製することもできる。
- [0027] また、shIL-18R α は、そのタンパク質のアミノ酸配列やX線等による結晶構造解析等から、遺伝子組み換えによる酵母や大腸菌等からの抽出や、化学合成等により、人工的に合成することも可能である。

- [0028] 本発明において用いられる(Y)1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつ当該shIL-18R α と同じ活性を有するタンパク質、あるいは、(y)1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなりかつ当該shIL-18R α と同じ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の、「当該shIL-18R α と同じ活性」とは、shIL-18R α と同様にヒトIL-18抗原と結合し得る能力を意味するものである。
- [0029] 本発明において、酵素免疫測定法の一方向の抗体として用いられる、(A)H44マウス抗ヒトIL-18レセプター α モノクローナル抗体(以下、H44マウス抗hIL-18R α と記載する。)と同じエピトープを認識し得る、抗ヒトIL-18レセプター α モノクローナル抗体としては、マウス、ラット、ラビット、ヒトもしくはハムスター抗体が挙げられるが、(a)マウス抗体が好ましく、具体的には、以下の3種類が例示される。
- [0030] (a1)H44マウス抗hIL-18R α
(a2)MAB840マウス抗ヒトIL-18レセプター α モノクローナル抗体(R&D Systems社製, Minneapolis, MN, USA, 以下、MAB840マウス抗hIL-18R α と記載する。)
(a3)117-10Cマウス抗ヒトIL-18レセプター α モノクローナル抗体(Hayashibara Biochemical Laboratories Inc.社製, Okayama, Japan, 以下、117-10Cマウス抗hIL-18R α と記載する。)
- [0031] これらは、もう一方に用いられる、マウス、ラット、ラビット、ヒトもしくはハムスター抗hIL-18R α モノクローナル抗体又は後述のポリクローナル抗体と、異なるエピトープを認識し得るものであれば良い。
- [0032] (a1)H44マウス抗hIL-18R α は公知のモノクローナル抗体であり、Pharminogen, Serotec, eBioscienceから入手可能である。
- [0033] (a2)MAB840マウス抗hIL-18R α は公知のモノクローナル抗体であり、R&D Systemsから入手可能である(R&D Systems Catalog No.MAB840)。
- [0034] (a3)117-10C抗hIL-18R α は公知のモノクローナル抗体であり、Hayashibara Biochemical Laboratories Inc.から入手可能である(J. Biol. Chem. Vol.272,No.41,Issue of October 10, pp.25737-25742,1997)。
- [0035] 本発明において用いられる抗ヒトIL-18レセプター α ポリクローナル抗体とは、公知

のポリクローナル抗体である。ポリクローナル抗体とは、異なるエピトープを認識し得る抗体の集合体であり、ポリクローナル抗体全体としては、種々のエピトープの認識が可能である。従って、この本発明で用いる抗ヒトIL-18レセプター α ポリクローナル抗体は、上述のモノクローナル抗体とは、異なるエピトープを認識することができ、またその認識するエピトープの位置が、抗ヒトIL-18レセプター α モノクローナル抗体の認識するエピトープの位置と、立体障害の起こりにくい位置にあると予想される。

[0036] 本発明の測定方法においては、上述の(A)H44マウス抗ヒトIL-18レセプター α モノクローナル抗体(以下、H44 マウス抗hIL-18R α と記載する。)と同じエピトープを認識し得る、抗ヒトIL-18レセプター α モノクローナル抗体以外にも、(1)抗ヒトIL-18レセプター α モノクローナル抗体を用いることができるが、その際には、当該抗体が認識するエピトープと、異なるエピトープを認識し得るモノクローナル抗体や、(2)抗ヒトIL-18レセプター α ポリクローナル抗体等を用いることができる。

[0037] (1)としては、マウス抗体が好ましく、(2)としては、ラビット抗体が好ましい。

[0038] 尚、このラビット抗ヒトIL-18レセプター α ポリクローナル抗体は、瀬谷司先生(大阪成人病センター、Koizumi H, Sato-Matsumura KC, Nakamura H, Shida K, Kikkawa S, Matsumoto M, Toyoshima K, Seya T. Distribution of IL-18 and IL-18 receptor in human skin: various forms of IL-18 are produced in keratinocytes. Arch Dermatol Res 2001;293:325-333.)から入手可能である。

[0039] 本発明のshIL-18R α の測定方法においては、上記のモノクローナル抗体のうち一種と、上記のポリクローナル抗体を用いることができ、いずれを第一次抗体としても良いが、capture抗体として固層化するためには、選択性の高い、モノクローナル抗体を用いることが好ましい。従って、本発明の生体試料中のshIL-18R α 測定用キットにおいても、第一次抗体として、上記いずれかのモノクローナル抗体を固層化したものを用いることが好ましい。

[0040] 本発明において、第一次抗体の固層化対象には、ガラス、プラスチック、微粒子、磁性微粒子、の不溶性物質を利用することができ、その形状もチューブ等の器壁、ビーズ、蛋白性微粒子、鉄製微粒子、マイクロプレート、イムノクロマトグラフィー用濾紙、グラスフィルター等とすることができるが、マイクロプレートが一般的である。

[0041] 本発明において、第二次抗体として用いられる抗体は、例えば次のような方法で検出することができる。

第二次抗体に、ビオチンを結合させておき、サンドイッチ法の実施後に、ストレプトアビジン結合西洋ワサビペルオキシダーゼを添加し、ビオチンにアビジンを結合させる。西洋ワサビペルオキシダーゼの酵素基質を加え、その酵素活性を測定することで、サンドイッチ法により捕捉された可溶化ヒトIL-18レセプター α を測定する。

このほか、第二次抗体の標識には、公知の放射性アイソトープ、酵素、蛍光物質、化学発光物質、着色物質等を利用することもできる。

[0042] 本発明の自己免疫疾患の診断方法は、上記の可溶化ヒトIL-18レセプター α の測定方法を用いて実施することができる。

自己免疫疾患としては、関節リュウマチ、間質性肺炎、膠原病等が挙げられる。

[0043] 本発明のshIL-18R α 測定用キットには、第一次抗体と第二次抗体の他、固層化対象、標識、緩衝液等を適宜組み合わせることができる。また、本発明のshIL-18R α 測定用キットには、更に、抗体から、shIL-18R α 抗原を遊離させるための酸溶液(例えばpH3.0, 25 mM Glycine, 150 mM NaCl等)を加えることもできる。

[0044] 本発明のshIL-18R α の測定方法及びshIL-18R α 測定用キットは、生体試料中のshIL-18R α 測定のほか、試験管レベルのshIL-18R α 測定にも使用することができる。

[0045] 本発明の(X)shIL-18R α 又は(Y)1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつ当該shIL-18R α と同じ活性を有するタンパク質は、IL-18に起因する疾患の予防又は治療剤や、肺障害等の予防又は治療剤に用いることができ、また、後述するようにグラム陰性菌大腸菌等のグラム陰性及び陽性菌等の細菌由来の毒素に起因する疾病の治療効果も有することから、各種の医薬組成物として有用である。

[0046] また、後述する実施例で確認したように、生体にIL-18R α を過剰発現させたTGマウスの血清中には、可溶性IL-18受容体が多量に存在する。従って、ヒトにhIL-18R α 遺伝子を導入し、hIL-18Rを過剰発現させることによって、血清中にshIL-18Rを大量に産生させることができ、それによって上記の様な各種の疾病に対する遺伝子治療

が可能となる。

実施例 1

[0047] (ELISA法による血清又はBAL中shIL-18R α 抗原の確認)

PBS緩衝液に溶解した4 μ g/mlのH44 マウス抗hIL-18R α を、ELISA plate(Nunc 製)に100 μ l/well分注し、4℃で一晩置き、第一次抗体であるH44 マウス抗hIL-18R α を、プレートに固層化した後、0.5%のTwin20(界面活性剤)を含むPBS緩衝液200 μ lで2回洗浄した。

[0048] 第二次抗体のプレートへの非特異的接着防止のため、のBlock Ace(大日本製薬 製)を200 μ l/well添加し、室温で2時間置き、ブロッキングを行った後、再び、0.5%のTwin20を含むPBS緩衝液200 μ lで2回洗浄した。尚、室温で2時間に変えて、4℃で一晩置いても良い。

[0049] 被検試料である、人間の血清(4倍希釈)及びBAL(気管支肺胞洗浄液の原液)を、各々100 μ l/well分注した。また、標準のhIL-18R α 抗原溶液として、recombinant human IL-18R α (R&D製)100 μ g/mlを希釈して、種々の倍率の希釈溶液を作成し、同様にそれぞれ別のwellに分注した。分注後、室温で2時間後、第一次抗体に、標準hIL-18R α 抗原又は血清及びBAL中のshIL-18R α 抗原を結合させた後0.5%のTwin20を含むPBS緩衝液200 μ lで各wellを3回洗浄した。

[0050] 次に、40%のBlock Aceに2 μ g/mlの濃度となるように溶解した、第二次抗体であるビオチン結合ラビット抗hIL-18R α ポリクローナル抗体溶液を、100 μ l/well分注し、室温で90分置き、第二次抗体をshIL-18R α 抗原に結合させた後、0.5%のTwin20を含むPBS緩衝液200 μ lで各wellを4回洗浄した。

[0051] 0.5 μ g/mlのストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼを、各wellに100 μ lずつ添加し、室温で30分間置き、ビオチンにアビジンを結合させた後、0.5%のTwin20を含むPBS緩衝液200 μ lで各wellを5回洗浄した。

[0052] 西洋ワサビペルオキシダーゼの酵素基質であるABTS (ELISA POD Substrate A.B.T.S Kit, ナカライ, 京都)を100 μ l/well加え、室温で30分間置き、酵素反応を起こさせた後、停止液100 μ l/wellを加えて酵素反応をストップさせた。

[0053] 450nm(main)及び650nm(sub)の吸光度を測定し、標準hIL-18R α 抗原の量と

比較することによって、被検試料である、血清及びBAL中の、shIL-18R α の量を測定した。

[0054] 健常人の血清中のshIL-18R α は 159.2 ± 89.5 ng/ml ($n=45$)であった。また関節リュウマチ(RA)患者の血清中shIL-18R α は 233.5 ± 109.2 ng/ml ($n=34$)であった。リュウマチ(RA)患者の血清中shIL-18R α は健常人の血清より有意に高かった($p=0.00216$, unpaired Student t-test)。また間質性肺炎患者の血清中shIL-18R α は 3361.8 ± 2307.3 ng/ml ($n=21$)でBAL中のshIL-18R α は 2.2 ± 1.5 ng/ml ($n=33$)であった。

[0055] このことは、血清やBAL液中の、shIL-18R α の存在を示している。また、健常人に比べて、リュウマチ患者や間質性肺炎患者で、血清中のshIL-18R α が明らかに多かったことから、本発明のshIL-18R α の測定方法が、リュウマチや間質性肺炎患者等の病気の診断方法として有用であることが分かった。

[0056] (血清中shIL-18R α 抗原の存在の確認及び親和性確認試験)

H44 マウス抗hIL-18R α 抗体をHiTrap NHS-activated HPカラム(Pharmacia Biotech Ab, Uppsala, Sweden)にカップリングしヒト血清をこのアフィニティカラムを用いてアフィニティカラムクロマトグラフィにかけ、親和性を確認した。結合バッファーは10 mM phosphate buffer pH6.8, 洗浄バッファーは10 mM phosphate buffer, 50 mM NaCl, pH6.8, 溶出バッファーは100 mM glycine buffer pH2.5, 中和バッファーは1M phosphate buffer pH8.0を用いた。ヒト血清サンプルを結合バッファーで2倍希釈し0.45 μ m filterで濾過し、結合バッファーであらかじめ平衡化したH44 マウス抗hIL-18R α 抗体アフィニティカラムにかけた。洗浄バッファーでアフィニティカラムを洗浄する。溶出バッファーをカラムに流し、溶出バッファー1mlごとに50 μ l中和バッファーの入ったチューブに入れて回収(回収順にFraction番号1, 2, 3...とする)しUV280nmでモニターした。回収したFractionを4℃でPBS緩衝液で透析した。UV280nmでモニターはFraction番号1-8でそれぞれ0.0687, 0.3598, 0.7073, 0.0949, 0.0377, 0, 0, 0だった。透析したFraction番号1-8を、上述のサンドイッチELISA法でshIL-18R α を測定したところ、<200, 1797, 1778, 1259, <200, <200, <200, <200 ng/mlであった。つまりFraction番号2,3,4にshIL-18R α が存在することが確認で

きた。このようにヒト血清から採取したshIL-18R α は、H44 マウス抗hIL-18R α 抗体アフィニティカラムクロマトグラフィにかけて、親和性を確認した。

[0057] (ウェスタンブロットティングによる抗原特異性及び分子量確認試験)

上記で透析したFraction番号1-8を、H44 マウス抗hIL-18R α 抗体を用いてウェスタンブロットティングで解析した。図1に示すようにFraction番号2,3,4に約60kDaの分子量にH44 マウス抗hIL-18R α 抗体が認識するshIL-18R α の存在が確認された(Fraction番号2,4のものも、添付図面では、影が薄いが確認されている)。この結果は上記のアフィニティカラムクロマトグラフィ、サンドイッチELISA法の結果と一致した。以上の結果から、血清に確かにshIL-18R α が存在していることが、確認された。

実施例 2

- [0058] ヒトリンパ球を 2×10^6 個/mLの細胞密度で10%FCSを加えたRPMI-1640で浮遊した。このリンパ球を未刺激、LPS (100 ng/mL)、もしくはマイトジェンPMA (10 ng/mL)で刺激した。培養上清中にshIL-18Rが1765 ng/mL, 2793 ng/mL, 2885 ng/mLが検出された。一方リンパ球を加えていない10%FCS PMI-1640中のshIL-18Rは170 ng/mL以下であった。つまり刺激リンパ球から多量のshIL-18Rが産生された。そこでLPS (100 ng/mL)、もしくはマイトジェンPMA (10 ng/mL)等でリンパ球を刺激し、その培養上清中から、HPLCや抗IL-18R α 抗体を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて精製することによって、可溶化IL-18受容体を得た。この結果、shIL-18Rは、もともと細胞の培養液中にも存在するものであるが、LPSやPMA等の刺激により、過剰に発現していることが分かった。

実施例 3

[0059] [可溶化IL-18R α による治療効果の確認]

(動物モデルにおける、可溶化IL-18R α の過剰発現誘導)

図2の様にVA-hCD2 vector(Zhumabekov, Journal of Immunological Methods, 185 (1995), 133-140)のSnaBIサイトにマウスIL-18R α のcDNA 1.6Kbを挿入し、KpnI/NotIで切り出しC57BL/6(B6)マウスの受精卵に常道に従い注入した。トランスジェニック(TG)マウスをNo. 17, 27, 51, 56の4ライン樹立した。この4ラインの10週齢のTGマウスとコントロールwild type (WT) B6マウス(WT#1, WT#2)から脾細胞を取り出し 2×10^6

個/mLの細胞密度で10%FCSを加えたRPMI-1640で浮遊した。

抗マウスCD3抗体(1 μ g/mL), ヒトIL-2 (200 U/mL), マウスIL-18 (200 ng/mL), ヒトIL-2 (200 U/mL)プラスマウスIL-18 (200 ng/mL)の存在下で18時間培養しIFN- γ をELISAキット(R&D社製)で測定した。図3に示すようにWTに比べTGマウスの脾細胞は著明にヒトIL-2 (200 U/mL)プラスマウスIL-18 (200 ng/mL)に反応しIFN- γ を産生した。

また抗IL-18R α 抗体を用いた膜表面抗原解析でTGマウスはWTマウスに比べリンパ球上にIL-18R α を強く発現した。

可溶性IL-18R α 受容体を、我々が樹立したELISA法で測定すると、WTマウスの血清では、限界希釈法(limiting dilution method)で測定しても検出限界以下であった。一方、TGマウスの血清を限界希釈法ではx4希釈以上で測定すると、可溶性IL-18R α 受容体の検出が可能であった。つまり、可溶性 IL-18 α 受容体はTGマウスの血清中に大量に存在していた。

[0060] 以上の結果は、我々が樹立したTGマウスには

1. IL-18に反応可能なIL-18受容体 α を過剰に発現し
 2. その一部が可溶化して
 3. 血清中に可溶性 IL-18受容体 α が大量に存在
- することを証明している。

以後の実験にはライン番号51を用いた。以下、CD2-IL-18R α #51とする。

[0061] (過剰発現可溶化IL-18R α による、毒素に対する治療効果の確認)

8から11週齢の雌のTGマウス(CD2-IL-18R α #51)及びコントロールwild type B6マウスを各10匹ずつ用いた。グラム陰性菌大腸菌由来のlipopolysaccharide (LPS) (E. coli serotype o55:B5 catalog No. L4005, Sigma [St. Louise, MO]) 40 μ g/g 体重を day 1に腹腔内投与した。図4に示すようにLPSに対する感受性はTGマウスの方がWTマウスより低い。つまりTGマウスはLPSに対し抵抗性を持った。この結果は過剰の可溶性 IL-18 受容体は生体で菌由来の毒素(endotoxin, exotoxin)に対し治療効果を持つことが判明した。

[0062] (可溶化IL-18R α による抗ガン剤の副作用に対する予防・治療効果の確認)

6週齢の雌のTGマウス(CD2-IL-18R α #51)及びコントロールwild type B6マウス各5匹にBLM (ブレオマイシン, bleomycin) 2mgをday 1に腹腔内投与した。更にBLM 2mgをday 8に腹腔内投与した。Day28でマウスの肺を20%ホルマリンで還流し固定した。作製したパラフィンブロックはHE染色を行った。WTマウス(図5, 左)に比べTGマウス(図5, 右)は、BLMによる肺障害(間質性肺炎、肺線維症)を顕著に抑制した。この結果は、過剰の可溶性 IL-18 受容体は肺障害に対し治療効果を持つことを示している。

図面の簡単な説明

- [0063] [図1]ウェスタンブロッティングによる、透析試料の抗原特異性及び分子量確認結果を表す図である。
- [図2]マウスIL-18R α 遺伝子を含む、TGマウス作成用遺伝子の模式図である。
- [図3]脾細胞の、IFN- γ 産生量を表す図である。
- [図4]TGマウス及びWTマウスのLPS感受性を表す図である。
- [図5]shIL-18R α による肺障害の抑制効果を表す図である。

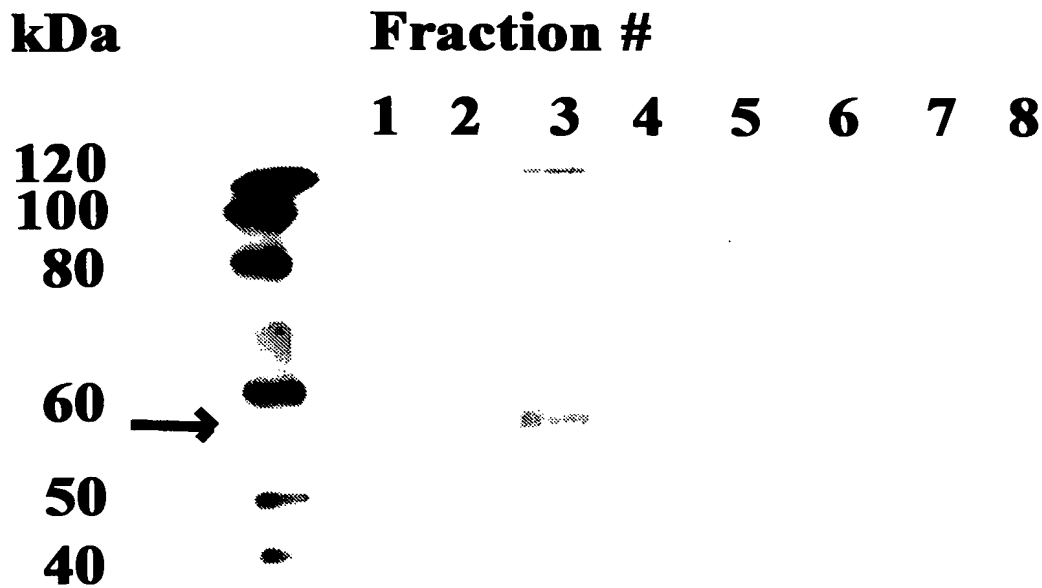
請求の範囲

- [1] 可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α 。
- [2] 下記(A)の抗体を用いることを特徴とする、酵素免疫測定法による可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α の測定方法。
(A) H44マウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体と同じエピトープを認識し得る、抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体
- [3] (A)が以下の(a)であることを特徴とする、請求項2記載の可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α の測定方法。
(a) H44マウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体と同じエピトープを認識し得る、マウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体
- [4] (a)が、以下の(a1)～(a3)のいずれかであることを特徴とする、請求項3記載の可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α の測定方法。
(a1) H44マウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体
(a2) MAB840マウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体
(a3) 117-10Cマウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体
- [5] もう一方の抗体が、以下の(B)であることを特徴とする、請求項2乃至4のいずれかに記載の可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α の測定方法。
(B) 抗ヒトインターロイキン18レセプター α ポリクローナル抗体
- [6] (B)が以下の(b)であることを特徴とする、請求項5記載の可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α の測定方法。
(b) ラビット抗ヒトインターロイキン18レセプター α ポリクローナル抗体
- [7] 下記(1)の抗体を固層化した第一次抗体と、下記(2)の第二次抗体とを用い、可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α を検出することを特徴とする請求項7記載の可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α の測定方法。
(1) 抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体
(2) 抗ヒトインターロイキン18レセプター α ポリクローナル抗体
- [8] 請求項2乃至7のいずれかに記載の可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α の測定方法を用いることを特徴とする、自己免疫疾患の診断方法。

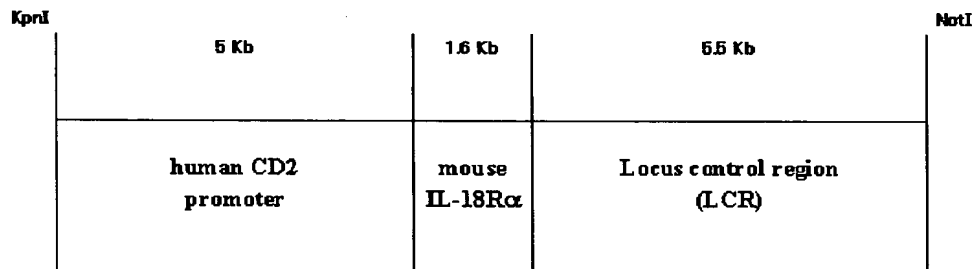
- [9] 下記の(A)の抗体を、固層化抗体又は標識化抗体として含有することを特徴とする、可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α 測定用キット。
(A) H44マウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体と同じエピトープを認識し得る、抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体
- [10] 一方が固層化され、他方が標識化された(1)及び(2)2種の抗体を含有することを特徴とする、可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α 測定用キット。
(1) マウス抗ヒトインターロイキン18レセプター α モノクローナル抗体
(2) ラビット抗ヒトインターロイキン18レセプター α ポリクローナル抗体
- [11] 下記(X), (Y)又はこれらをコードする遺伝子からなる群から選択される一種以上を有効成分として含むことを特徴とする、医薬組成物。
(X) 可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α
(Y) 1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつ当該可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α と同じ活性を有するタンパク質
- [12] 下記(X), (Y)又はこれらをコードする遺伝子からなる群から選択される一種以上を有効成分として含むことを特徴とする、インターロイキン18に起因する疾患の予防又は治療剤。
(X) 可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α
(Y) 1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつ当該可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α と同じ活性を有するタンパク質
- [13] 下記(X), (Y)又はこれらをコードする遺伝子からなる群から選択される一種以上を有効成分として含むことを特徴とする、肺障害の予防又は治療剤。
(X) 可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α
(Y) 1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなりかつ当該可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α と同じ活性を有するタンパク質
- [14] 下記(x)又は(y)を有効成分として含むことを特徴とする、医薬組成物。
(x) ヒトインターロイキン18レセプター α 遺伝子
(y) 1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなりかつ当該可溶化ヒトインターロイキン18レセプター α と同じ活性を有するタンパク質をコード

する遺伝子

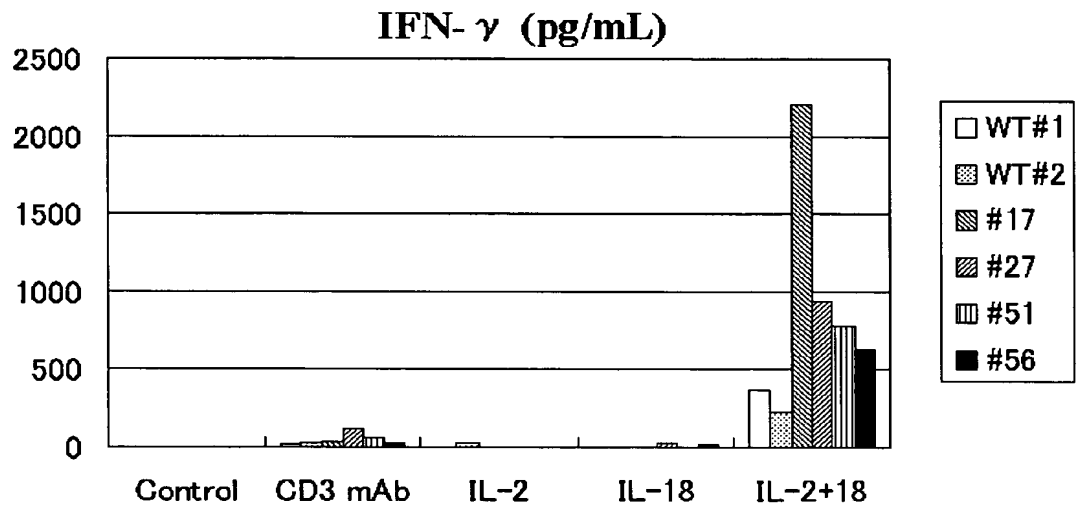
[Figure 1]



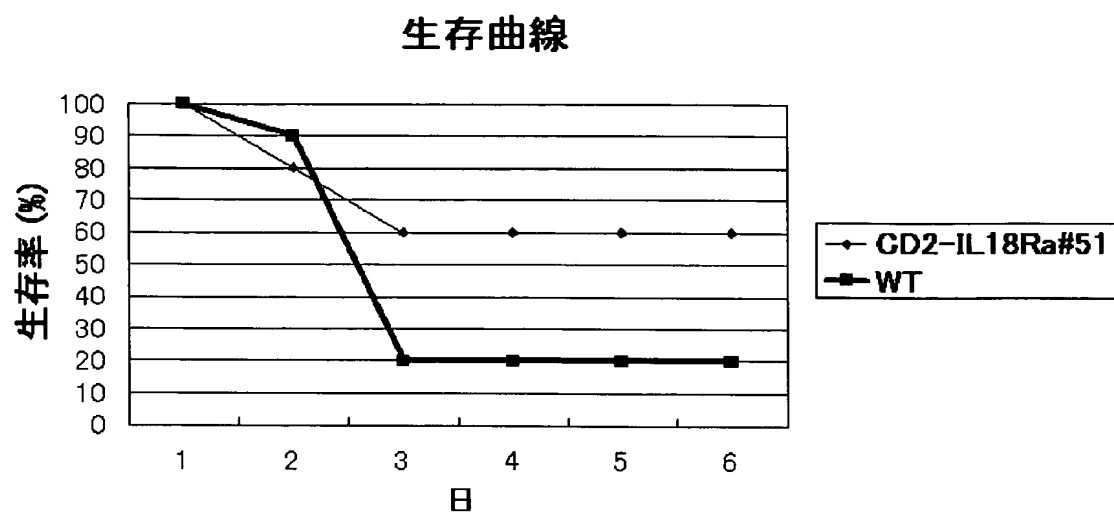
[Figure 2]



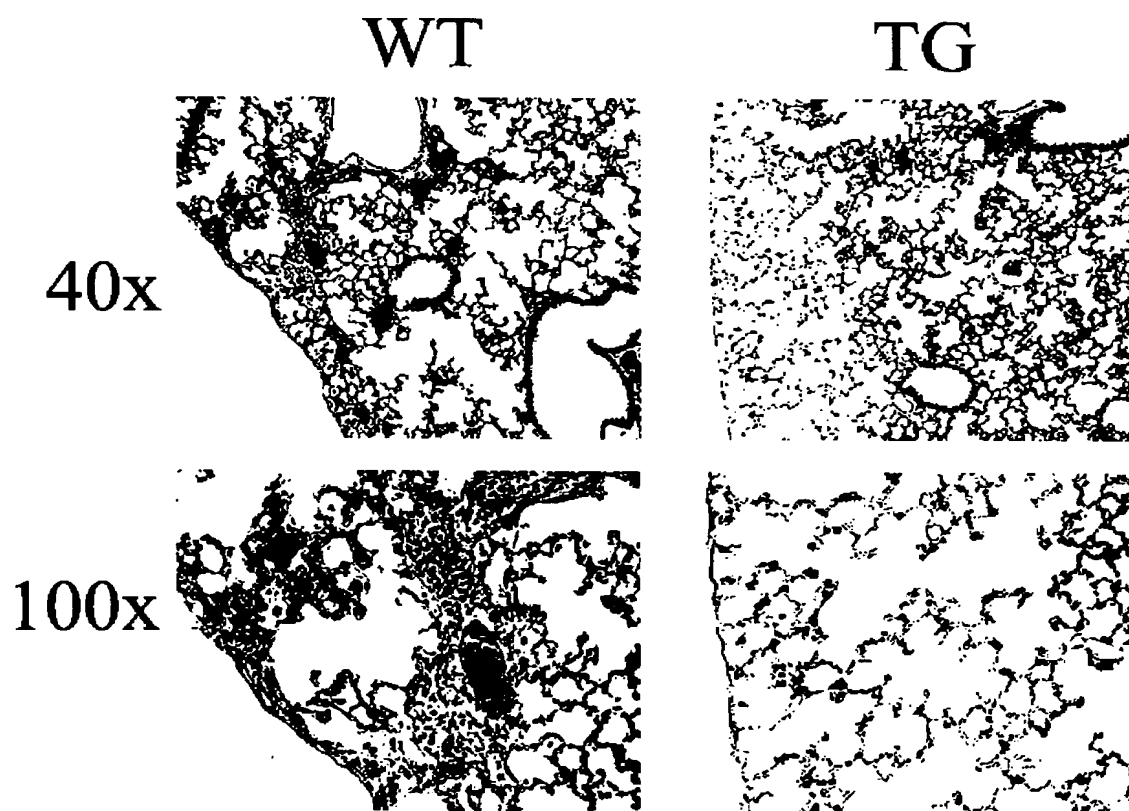
[Figure 3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/010621

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/715, G01N33/53, G01N33/543, G01N33/577, C07K16/28, A61K38/00, A61K31/7088, A61P43/00, A61P11/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/715, G01N33/53, G01N33/543, G01N33/577, C07K16/28, A61K38/00, A61K31/7088

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/MEDLINE/BIOSIS/SPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Reznikov, Leonid L.; Kim, Soo-Hyun; Zhou, Li; Bufler, Philip; Goncharov, Igor; Tsang, Monica; Dinarello, Charles A., The combination of soluble IL-18R α and IL-18R β chains inhibits IL-18-induced IFN- γ , Journal of Interferon and Cytokine Research (2002), 22(5), 593-601	1 11-14
Y	JP 11-100400 A (Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo), 13 April, 1999 (13.04.99), Full text & EP 850952 A	11, 12, 14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
19 August, 2004 (19.08.04)

Date of mailing of the international search report
07 September, 2004 (07.09.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/010621

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/80891 A (Nippon Organon Kabushiki Kaisha), 01 November, 2001 (01.11.01), Pages 1, 3, 5 & EP 1321153 A	11-14
A	Gaughran, F. [Reprint author]; O'Neill, E.; Cole, M.; Collins, K.; Daly, R.J.; Shanahan, F., Increased soluble interleukin 2 receptor levels in schizophrenia., Schizophrenia Research, (09 February, 1998 (09.02.98)), Vol.29, No.3, pages 263 to 267	1-7, 9-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/010621

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 8 pertains to diagnostic methods to be practiced on the human body.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int cl7 C07K 14/715, G01N 33/53, G01N 33/543, G01N 33/577, C07K 16/28, A61K38/00, A61K31/7088, A61P43/00, A61P11/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int cl7 C07K 14/715, G01N 33/53, G01N 33/543, G01N 33/577, C07K 16/28, A61K38/00, A61K31/7088

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Reznikov, Leonid L.; Kim, Soo-Hyun; Zhou, Li; Bufler, Philip; Goncharov, Igor; Tsang, Monica; Dinarello, Charles A., The combination of soluble IL-18R α and IL-18R β chains inhibit s IL-18-induced IFN- γ , Journal of Interferon and Cytokine Research (2002), 22(5), 593-601	1 11-14
Y	JP 11-100400 A (株式会社林原生物化学研究所) 1 999.04.13, 文献全体 & EP 850952 A	11, 12, 14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.08.2004

国際調査報告の発送日

07.9.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内藤 伸一

4B

8615

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 01/80891 A (日本オルガノン株式会社) 200 1. 11. 01, 第1, 3, 5頁 & EP 1321153 A	11-14
A	Gaughran, F. [Reprint author]; O'Neill, E.; Cole, M.; Collins, K.; Daly, R. J.; Shanahan, F., Increased soluble interleukin 2 receptor levels in schizophrenia, Schizophrenia Research, (Feb. 9, 1998) Vol. 29, No. 3, pp. 263-267	1-7, 9-14

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

請求の範囲8の発明は、人体の診断方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。